

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Das elektronenmikroskopische Bild des Cornea-Stromas vom Frosch

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

medizinischen Fachbereichen der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carlos Alberto Menéndez López

aus Moyuta/Guatemala

1972

Aus dem II. Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Das elektronenmikroskopische Bild des Cornea-Stromas vom Frosch

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

medizinischen Fachbereichen der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Carlos Alberto Menéndez López

aus Moyuta/Guatemala

Referent: Professor Dr. med. Willy Schwarz

Korreferent: Professor Dr. med. Hans-Joachim Merker

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 7. November 1972



Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Material und Methode	6
Befunde	10
Diskussion	17
Zusammenfassung	23
Literaturverzeichnis	
Lebenslauf	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Das elektronenmikroskopische Bild des Cornea-Stromas vom Frosch.

Einleitung:

Die Cornea der Säugetiere weist eine Reihe von überraschenden Eigenschaften auf (Lit. siehe JAKUS, 1956, 1967 LANGHAM et al. 1969; ROHEN, 1964 und SCHWARZ und v. KEYSERLINGK, 1966).

1. Auf morphologischer Ebene imponieren die hochgeordnete Struktur des Stromas, die Vielschichtigkeit des Cornea-Epithels und die klar definierten Trennlinien unter dem Epithel und dem Endothel, die Bowman'sche bzw. Descemet'sche Membran.
2. Im funktionellen Sinne beeindruckt die ausgeprägte Transparenz, eine Voraussetzung des Sehvorganges.

Die elektronenmikroskopische Forschung hat sich bald dieses Gewebes angenommen, um die morphologischen Grundlagen der Transparenz darzustellen und damit den Vorgang an sich besser verstehen zu können. Dabei wurde aber hauptsächlich die Cornea vom Menschen und von den anderen häufig benutzten Laboratoriumstieren berücksichtigt. Zunächst zeigte sich dabei, daß die dickste und wichtigste Schicht - das Stroma der Cornea - ein typisches Bindegewebe darstellt. (ROHEN, 1964; JAKUS, 1969; MAURICE, 1961; SCHWARZ, 1961; SCHWARZ, 1953).

Es ist also gekennzeichnet durch isoliert liegende, locker verstreute Zellen, zwischen denen sich eine mächtig entwickelte Interzellular-Substanz befindet. Diese Interzellular-Substanz oder Grundsubstanz ent-

hält in Analogie zu den anderen Bindegewebsarten kollagene Fibrillen und eine interfibrilläre Kittsubstanz.

Obwohl also alle Kriterien, die zur Definition eines Bindegewebes gehören, vorhanden sind, zeichnet sich dennoch die bindegewebige Interzellulärsubstanz des Cornea-Stromas durch einige Besonderheiten aus. Die Fibrillen bleiben bei den bisher untersuchten Tier-species während des ganzen Lebens sehr dünn und damit fast auf einer embryonalen Stufe. Das für andere Fibrillenarten typische Fibrillenwachstum bleibt also aus (SCHWARZ et al., 1953).

Die Länge der Querstreifungsperiodik dieser Fibrillen - sonst typisch mit 640 Å zu berechnen - scheint ebenfalls mehr einem unreiferen Zustand zu entsprechen, da auch kürzere Perioden von etwa 200 Å Länge vorkommen. Darüber hinaus zeichnet sich die Kittsubstanz des Stromas durch einen Gehalt an Dermatan-Sulfat aus. Ein Mucopolysaccharid, das in den übrigen Bindegewebsbezirken sonst fast nicht zu finden ist (SCHWARZ und v. KEYSERLINGK, 1966, 1966).

Trotz des Gehaltes an großmolekularen Substanzen, (Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Kollagen), die darüberhinaus noch zu größeren Einheiten aggregiert sind, ist aber die normale Cornea völlig transparent. Als Ursache dieser Eigenschaft sind verschiedene Theorien entwickelt worden. Die älteste war wohl die, daß die sogenannte Grundsubstanz des Corneastromas

durch bestimmte optische Eigenschaften in der Lage ist, die Unterschiede der Brechungsindices der verschiedenen Strukturen des Gewebes so zu verändern daß eine "Maskierung" eintritt. (ROGGENBAU und WETT-HAUER, 1927 sowie Lit. siehe COULOMBRE and COULOMBRE, 1961; MAURICE, 1957).

Diese Theorie hat, da sie vor Anwendung der elektronenmikroskopischen Technik entwickelt wurde, keine morphologische Grundlage mehr, sondern nur noch historische Bedeutung.

Die zweite Theorie - von MAURICE (1957, 1960) entwickelt - basiert bereits auf elektronenmikroskopischen Befunden. Sie geht von der Voraussetzung aus, daß die dünnen kollagenen Fibrillen des Corneastromas ganz exakt in hexagonalen Packungen geordnet sind. Hier einfallende Lichtstrahlen würden dann an diesem Gitterwerk gebrochen werden und den Augenhintergrund somit nicht direkt, sondern als Beugungsdiagramm erreichen.

SCHWARZ und v. KEYSERLINGK (1966, 1969, 1969) konnten jedoch zeigen, daß diese geforderte Ordnung nicht vorhanden ist, sondern bei statistischen Auftragungen der räumlichen Verteilung keine Regelmäßigkeit festgestellt werden kann. Es wurde deshalb von diesen Autoren eine ausschlaggebende Bedeutung der Partikelgröße bei der Transparenzentstehung vermutet. So erscheint eine kolloide Lösung mit großen Partikeln trübe; enthält sie aber kleine Partikel, so sieht sie dagegen klar aus. Wesentlich für die Entstehung der Transparenz wäre also nicht die Ordnung der Fibrillen, sondern ihr geringer Durchmesser.

Zur Prüfung dieser Theorie ist die Untersuchung von Corneae anderer Tierarten sinnvoll. Sowohl die Fibrillendicke bestimmter Bindegewebsgebiete als auch die Ordnung der Fibrillen, das heißt ihr Textur wechselt von Spezies zu Spezies. Ein klassisches Beispiel ist das hochgeordnete subepidermale Bindegewebe von Amphibien, das beim Menschen völlig ungeordnet ist. (WEISS and FERRIS. 1956)

Es könnte also sein, daß bei anderen Tierspezies das Corneastroma dicke Fibrillen in ausgeprägter Ordnung enthält - eine Bestätigung der Hypothese von MAURICE - andererseits könnten aber völlig ungeordnete dünne Fibrillen vorkommen. Dieser ungeordnete Aufbau würde für die Theorie von SCHWARZ und Mitarbeitern sprechen (1966, 1968, 1969).

Die bisher vorliegenden Befunde von verschiedenen Spezies scheinen den Vorstellungen von SCHWARZ entgegenzukommen. So konnte JAKUS, 1964; GREIJL, 1972 bei Vögeln dünne Fibrillen und eine nur angedeutete Ordnung nachweisen.

Bei Molch und Gecko liegen die Verhältnisse ähnlich (E.SCHLICHTING, 1972; H.SCHLICHTING, 1972). Über die als Versuchstiere in der Physiologie auch für optische Experimente so häufig benutzten Frösche liegen jedoch noch keine genauen Befunde vor. Die Ausfüllung dieser Lücke ist aus verschiedenen Gründen wichtig. Zunächst reizt es natürlich, zu den oben angedeuteten Problemen der Transparenz auf der Grundlage auch der Befunde an dieser Tierart Stellung nehmen zu können. Damit könnten auch den Physiologen exakte morphologische Grundlagen für die Experimente und Überlegungen geboten werden.

Darüberhinaus scheint es aber an der Zeit, durch Komplettierung der Untersuchung an der Cornea bei verschiedenen Tieren eine zusammenfassende und vergleichende Morphologie der Cornea durchzuführen. Schließlich hatten wir die Hoffnung, eine abweichende Textur, d.h. eine abweichende Packung und Anordnung der Fibrillen bei den Fröschen zu finden. Solche Unterschiede können Einblicke in die Mechanismen und Ursachen vermitteln, die zur Ausbildung von bindegewebigen Texturen führen (Lit. siehe HACKELBERG, 1971). Darüber ist noch sehr wenig bekannt.

Material und Methode

Die Untersuchung erfolgte an ausgewachsenen Fröschen (*Rana esculenta*), die durch Dekapitation getötet wurden. Die Fixierung des Materials wurde auf drei verschiedene Arten durchgeführt.

1. Karnovski-Lösung und Nachfixierung mit einer Osmiumsäurelösung.
2. Vorausgehendes Einlegen der Cornea in Toluidinblaulösung (0,1 %ig) für 5 min gefolgt von einer Fixierung in Karnovski-Lösung mit Rutheniumrot und Osmiumnachfixierung.
3. Fixierung in Karnovski-Lösung mit Rutheniumrot und Osmiumnachfixierung.

Die Karnovski-Lösung ist zusammengesetzt aus:

3% Glutaraldehyd und 3 % Paraformaldehyd in einer 0,2 M Cacodylat Pufferlösung (pH 7,2). Die Rutheniumrot-Konzentration in der Karnovski-Lösung beträgt 2 %.

Die Osmium-Nachfixations-Lösung besteht aus einer

1 "igen Lösung in einem 0,1 M Phosphatpuffer. Danach erfolgt die stufenweise Entwässerung in der Acetonreihe:

30 %	:	15 min
50 %	:	60 min
75 %	:	2 Std
90 %	:	60 min
100 %	:	über Nacht

und die Behandlung in aussteigender Mikropal-Acetonreihe:

Mikropal		Aceton	
1	+	3	: 60 min
1	+	1	: 60 min
3	+	1	: 2 Std
9	+	1	: über Nacht

Anschließend wird die Einbettung in Mikropal mit Katalysatoren durchgeführt.

- a) bei Zimmertemperatur
- b) bei 37°C : über Nacht
- c) bei 60°C : 24 Stunden

Die Schnitte werden mit den LKB Ultratomen und Reichert-Mikrotomen hergestellt.

Die Aufnahmen stellten wir an Siemens Elmiskopen vom Typ I und Ia her bei einer Primärvergrößerung vom 1000 bis 40 000 und einer Strahlspannung von 80 kV.

Zur morphologischen Messung wurden Präparate gesucht, in denen die kollagenen Fibrillen parallel verlaufen und exakt senkrecht geschnitten waren.

Die Schnitte wurden bei einer primären Vergrößerung von 1 : 20 000 aufgenommen und teilweise photographisch auf Positiv-Papierabzüge nachvergrößert.

(1 : 3,5) Unter diesen Voraussetzungen - paralleler Verlauf der Fibrillen und Schnittebene senkrecht zur Längsachse der Fibrillen - kann man sagen, daß das Verhältnis von Kollagenvolumen zum Volumen der Kittsubstanz gleich ist dem Verhältnis der Fibrillenquerschnitte zum interfibrillären Flächenanteil.

Die Relation der Flächenanteile wurde nach der Punktzählmethode (WEIBEL; 1963) registriert. Dazu wurde ein Mikrofilm-Lese- und Vergrößerungsgerät benutzt.

(Fa. Tausch & Simon KG: Systematic 3 K).

Die Aufnahmen wurden dazu unter eine Vergrößerungslupe 1:12 eingelegt und auf eine Mattscheibe projiziert. Über diese projizierte Aufnahme wurde nun das WEIBEL'sche Punktgitter gelegt. Es enthält in einem Durchmesser von 10 cm 112 Punkte. Nun wurde die Zahl der Punkte gezählt, die auf ein Fibrillenquerschnitt fiel und diese Zahl verhält sich zu der Zahl der restlichen Punkte wie der Flächenanteil der kollagenen Fibrillen zur interfibrillären Fläche und damit auch, wie bereits weiter oben ausgeführt wie das Verhältnis des Kollagen-Volumens zum Volumen der Kittsubstanz. Wenn Punkte auf den Rand einer Fibrille fielen, wurde folgendermaßen vorgegangen: Alle Punkte, die auf den rechten Rand einer Fibrille fielen, wurden mitgezählt, die auf den linken Rand fielen, dagegen nicht.

Zur Bestimmung der Fibrillendicke und der Abstände der einzelnen Fibrillen voneinander benutzten wir ebenfalls das oben beschriebene Verfahren mit dem Mikrofilm-Lese- und Vergrößerungsgerät. Die Werte wurden dabei mit flexiblen Linealen bestimmt und dann später auf die wirklichen Größenverhältnisse zurückgerechnet.

Jeweils 200 Fibrillen wurden gemessen und in eine Verteilungskurve eingetragen.

Befunde

Die Epithelbindegewebsgrenze als vordere Begrenzung des Corneastromas unterscheidet sich deutlich von den bisher untersuchten Corneae anderer Tierspezies. Eine typische Bowman'sche Membran, also eine viele Mikron breite Verdichtung der bindegewebigen Interzellularsubstanz unter und parallel zur Epithelschicht, fehlt beim Frosch.

Dafür läßt sich eine klar konturierte, typische Basalmembran darstellen (Abb. 1). Sie ist etwa 300 - 500 Å dick, bei niedrigen und mittleren Vergrößerungen homogen dicht und verläuft in einem Abstand von 400 - 600 Å parallel zur basalen Zellmembran des Epithels. Bei höheren Vergrößerungen stellt sie sich als dichtes Netzwerk aus feinen Filamenten dar. Damit entspricht sie in ihrem morphologischen Bild dem der Basalmembranen aus vielen anderen Geweben der verschiedensten Tierarten. Direkt unter der Basalmembran folgt zum Stroma hin eine etwa 1 - 2 µ breite Zone, in der die Fibrillen noch nicht zu lamellenförmigen Bündeln geordnet sind, sondern einzeln oder zu kleinen Bündeln zusammengefaßt unregelmäßig verlaufen. Danach erst finden sich die Fibrillen zu den typischen Lamellen des Corneastromas. Allerdings sind hier in Epithelnähe die Lamellendicken meistens gering. (etwa 1 µ).

Die propria der Cornea besteht morphologisch aus Kollagenfibrillen, Fibrozyten und feinfilamentären Materialien (alle Abb.)

Die Kollagenfibrillen verlaufen annähernd parallel zur Hornhautoberfläche, aber in unterschiedlichem Winkel zueinander (selektiv uniplanar).

Sie sind zu lamellär geformten flachen Bündeln von Fibrillen, die parallel zueinander verlaufen, zusammengefaßt. Die Fibrillen einer Lamelle und die der Nachbarlamelle überkreuzen sich unter verschiedenen Winkeln. Eine genaue Angabe des Überkreuzungswinkels bzw. dessen Variationen sind bei der angewandten Schnittmethode nicht möglich. Wie den annähernd oberflächenparallelen Flachschnitten zu entnehmen ist, schwankt dieser Winkel jedoch erheblich. Die Anordnung der Fibrillen ist damit als selektiv uniplanar zu beschreiben.

Gelegentlich beobachtet man ein Ausscheren einzelner Kollagenfibrillen aus einer Lamelle und deren Fortsetzung in einer darüber oder darunter gelegenen Lamelle. Anfang und Ende einer bestimmten Lamelle läßt sich daher auf Grund des ständigen Zuflusses und Abspaltung von Kollagenfibrillen nicht angeben. Wenn die Lamellen sehr flach sind, bestehen sie nur aus wenigen übereinander gelegenen Fibrillen, sie können jedoch eine Höhe bis zu 5 μ erreichen.

Eine Querstreifung der dünnen Fibrillen ist bei kleiner und mittlerer Vergrößerung nicht zu erkennen. Nur bei hoher Auflösung läßt sich in den längsschnittenen Fibrillen eine sog. kontinuierliche Querstreifung nachweisen. Sie besteht aus kontinuierlich aufeinanderfolgenden dunklen und hellen Abschnitten mit einer Länge von 60 - 100 $\text{\AA}$ ohne daß eine

Ordnung dieser Streifen im Sinne einer Periodizität zu sehen ist (Abb. 6 und 8).

Zur Bestimmung der Dicke der Kollagenfibrillen wurden die Querschnitte von 200 Fibrillen ausgemessen. Nur vollständig runde Querschnitte wurden verwendet. Es ergab sich ein mittlerer Durchmesser von 25 nm. 96 % aller Werte lag zwischen 20 und 27 nm (Diagramm 1). Die Kollagenfibrillen bilden im Querschnitt kein regelmäßiges Muster. Nur gelegentlich findet man 4 6 oder 8 Fibrillen in angedeutet regelmäßiger Anordnung und gleichmäßigem Abstand.

Um eine Vorstellung über den Abstand der Kollagenfibrillen voneinander zu erhalten, wurde der Abstand vom äußeren Rand einer Fibrille zu dem der Nachbarfibrille gemessen. Der mittlere Abstand beträgt 399 Å, wobei 90 % der gefundenen Werte zwischen 350 und 450 Å lagen (Diagramm 2).

Als weiterer Parameter zur Charakterisierung des Aufbaues der Propria corneae kann der Prozentanteil des Kollagens am Gesamtgewebe morphometrisch bestimmt werden. Für diese morphometrische Auswertung zur Feststellung der Volumenverteilung von Kollagen und Kittsubstanz sind nur solche Bezirke des Hornhautstromas geeignet, in denen drei Kriterien vorhanden sind:

1. die kollagenen Fibrillen müssen exakt querschnitten sein, was sich an vollkommen runder Außenkontur der Fibrillen zeigt.
2. der zur Beurteilung dienende Bezirk muß eine genügende Ausdehnung besitzen.
3. Die Fibrillen-Darstellung muß auf eine gute Fixierung schließen lassen.

Als Zeichen für eine gute Fixierung gelten scharfe Außenkonturen der Fibrillen, gleichmäßiger Kontrast aller Fibrillen sowie Fehlen breiter Spaltbildungen zwischen den Fibrillen. Solche für die Auswertung geeigneten Bezirke des uns zur Verfügung stehenden Materials wurden elektronenmikroskopisch ausgenommen (ca. 60 Aufnahmen). Eine Berücksichtigung der Lage im Zentrum des Stromas, des Limbus, Epithels oder Endothels wurde nicht vorgenommen. Von diesen 60 Aufnahmen wurden 10 ausgewählt, die die größte Ausdehnung hinsichtlich optimal quergeschnittener kollagener Fibrillen enthielten. Diese Aufnahmen wurden in das Mikro-Film-Lese-Vergrößerungsgerät eingelegt und das Punktgitter nach WEIBEL darauf projiziert. Die Auswahl kann demnach als zufällige Stichprobe aus dem Stroma der Cornea betrachtet werden. Von jeder Aufnahme wurden 10 Areale ausgewertet. Die Anzahl der Treffer ist in Diagramm 3 eingetragen. Zur anschaulichen Darstellung der Volumen - Prozente der kollagenen Fibrillen wurden die gefundenen Werte nicht in einer Verteilungskurve, sondern als Summenhäufigkeitskurve aufgezeigt. Bei niedrigstem Wert (13 Treffer) auf der Abszisse beginnend wurde dessen Häufigkeit (1 x) auf der Ordinate in das Diagramm eingetragen. Als nächster Schritt wurde der nächstfolgende Wert (14 Treffer) mit der Häufigkeit des 1. (1 x) und seiner eigenen Häufigkeit (2 x) dargestellt. Dann der 3. mit der des 1., des 2. und der eigenen Häufigkeit usw. Daraus ergibt sich eine Treppenkurve. Da die Trefferzahl - wie unter Material und Methode näher

ausgeführt - als Maß für den Volumenanteil der kollagenen Fibrillen im Stroma angesehen werden kann, gibt die links von der Treppenkurve gelegene Fläche (schwarz) den kollagenen Volumenanteil, die rechte Fläche (weiß) den der Kittsubstanz an. Die Treppenkurve veranschaulicht die Variationsbreite des kollagenen Anteils. Es ergab sich ein mittlerer Kollagen-Volumenanteil von 21,4 vol.% bei einer Schwankung zwischen 13 bis 29 vol.%.

Das zweite Strukturelement - neben den Kollagenfibrillen des Interzellularraumes des Corneastromas stellt Verdichtungszone dar, die bei höherer Vergrößerung aus einem verfilzten, dichtgepackten Netzwerk feiner, unregelmäßig verlaufender Filamente bestehen (40 - 80 μ dick). Ihre Lokalisation ist typisch: Sie finden sich überwiegend zwischen den Fibrill lamellen, an den Fibrocyten, besonders in der Verlängerung ihrer Fortsätze (Abb. 1,5,7 und 8). Bei dem Versuch, ihre Form dreidimensional zu rekonstruieren, kommt man zu dem Ergebnis, daß es sich um wechselnd breite und dicke flachplattenförmige Gebilde handelt. Sie werden häufig durch die von einer in eine andere Lamelle ausstrahlenden Fibrillen durchbohrt (Abb.7 und Abb.8). An der Epithel- bzw. Endothel-Bindegewebsgrenze sind sie fast nie nachzuweisen.

Die Morphologie der hier im Corneastroma des Frosches vorkommenden Zellen entspricht weitgehend der, die bereits aus Untersuchungen an vielen Bindegewebsarten auch anderer Tierarten bekannt ist. Sie sind deutlich

bipolar geformt und enthalten einen ovalen, teilweise langgestreckten Kern (Abb. 5) mit deutlichen Chromatinverdichtungen. Im Cytoplasma kommen neben den üblichen Zellorganellen bis in die kleinsten Fortsätze kurze Hohlräume des rauhen endoplasmatischen Retikulums vor. Die Fortsätze selbst verzüngen sich in Abhängigkeit von der Entfernung vom Kern zunehmend. Sie können eine Breite von nur 1000 Å aber eine Länge bis zu 100 µ erreichen. Wegen der geringen Schnittdicke sind exakte Aussagen über die Länge der Fortsätze nicht sicher möglich. Im lichtmikroskopischen Bild dagegen lassen sich die dünnen Fortsätze nicht erfassen. Bei genauer Durchmusterung der Präparate mit dem Elektronenmikroskop scheint eine Verzweigung dieser Fortsätze möglich. Ein überzeugendes Bild für die Untermauerung dieser Ansicht gelang uns aber nicht. Die Form der Fortsätze kann rund, d.h. fingerförmig sein. Meistens sind sie aber abgeflacht und stellen sich im Querschnitt länglich oval dar. Plattenförmige Ausläufer kommen ebenfalls vor.

Der Abschluß des Corneastromas nach hinten zum Endothel der vorderen Augenkammer wird durch die Descemet'sche Membran gebildet (Abb. 2 und 3). Es handelt sich ähnlich wie bei der unter dem Epithel bereits beschriebenen Basalmembran um eine Verdichtungszone unterhalb des Endothels. Sie ist jedoch sehr viel breiter und kann Dicken bis zu 2 µ erreichen. Ihre Grenze zum Stroma ist relativ glatt und zeigt streckenweise eine basalmembranähnliche 400 - 500 Å

breite Verdichtungszone als Abschluß. Von dieser Seite bis zum Endothel nimmt meistens die Dichte deutlich ab. Die Descemet'sche Membran kann entweder direkt an die Zellmembran des Endothels angrenzen oder aber es liegt dazwischen eine 300 - 500 Å breite hellere Zone. Bei hoher Vergrößerung besteht sie aus feinen, etwa 70 - 90 Å dicken Filamenten, die im Winkel zueinander aber parallel zum Endothel verlaufen (selektiv uniplanar). An manchen Stellen läßt sich noch eine Matrix darstellen, in die die Filamente eingebettet sind.

Diskussion:

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Cornea des Frosches ergab ein Bild, das prinzipiell dem entspricht, das bei den verschiedenen bisher untersuchten anderen Spezies schon geschildert wurde.

(ROHEN, 1964). Sie besteht aus drei Schichten:

1. dem mehrschichtigen Epithel, 2. dem Stroma und
3. dem einschichtigen Endothel. In den Einzelheiten lassen sich aber deutliche, morphologisch faßbare Unterschiede nachweisen. Der wesentlichste Unterschied beruht auf dem Fehlen der Bowman'schen Membran unter dem Epithel. Während bei den Säugetieren hier eine mehrere Mikron breite Verdichtungsschicht lokalisiert ist, findet sich beim Frosch hier nur eine dünne Verdichtungsschicht im bindegewebigen subepithelialen Interzellularraum, die in allen Einzelheiten einer normalen Basalmembran entspricht. Dieser Befund ist zur Deutung der phylogenetischen Entwicklung der Bowman'schen Membran von gewisser Bedeutung. Er weist darauf hin, daß die Bowman'sche Membran der Mammalia und auch Aves sich aus einer normalen Basalmembran entwickelt haben. Diese Kenntnis läßt einige Rückschlüsse auf die Zusammensetzung dieser Schicht zu. In Analogie zu einigen Befunden an isolierten Basalmembranen kann deshalb vermutet werden, daß auch die Bowman'sche Membran einen ähnlichen Aufbau hat. Die isolierten Basalmembranen enthalten u.a. größere Mengen Kollagen in wenig aggregierter Form, nichtkollagenes Eiweiß, einige uronsäurefreie oder uronsäurehaltige Polysaccharide, Lipide und Glykolipide

(BONTING et al., 1961; v. BRUCHHAUSEN und MERKER, 1965; DISCHE et al., 1965) Auf der Basis dieser chemischen Befunde kann angenommen werden, daß die filamentäre Komponente der Bowman'schen Membran das Kollagen darstellt und die übrigen Bestandteile in der Matrix lokalisiert sind.

Die Vorstellung ermöglicht auch eine Erklärung für das Vorkommen geordneter Filamentstrukturen oder quergestreifter Gebilde, die hier beschrieben wurden (SCHWARZ, 1972; JAKUS, 1956; FEHER und VALU, 1969). Die kollagenen Bausteine liegen hier normalerweise in Form feiner Filamente ($40 - 60 \text{ \AA}$) vor. Bei verstärkter Aggregationsneigung ist es aber natürlich möglich, daß größere Einheiten mit dichter Packung, z.B. Fibrillen oder mit weniger dichter Packung, z.B. ein Raumgitter aus Filamenten entstehen. Ähnliche Überlegungen können auch für die Morphologie der Descemet'schen Membran angestellt werden. Die Ursachen und Mechanismen der Entwicklung der dickeren Bowman'schen Membran aus einer typischen Basalmembran können allein aus morphologischen Bildern nicht abgelesen werden. Neben mechanischen Faktoren, z.B. Veränderungen des Augeninnendruckes, kann man auch Veränderungen der Umweltbedingungen diskutieren. Hier liegt es nahe, an Probleme der Austrocknung beim Leben auf der Lande zu denken. Es wäre interessant, Tierarten zu finden, bei denen die Entwicklung zur dicken Bowman'schen Membran gerade beginnt. Hier könnte besser zu den eben diskutierten Problemen Stellung genommen werden.

Beim Vergleich der übrigen Teile des Corneastromas des Frosches mit den Verhältnissen bei den anderen, bisher bereits elektronenmikroskopisch untersuchten Tierarten, fällt noch ein weiterer Unterschied auf, der jedoch mehr quantitativer Natur ist. Die Fibrillen sind wenig dicht und sehr unregelmäßig gepackt. Während bei den anderen Species, z.B. auch bei den Aves die Packung der Fibrillen stellenweise dichter und regelmäßiger ist, läßt sich bei dem Frosch kein Anhalt für irgendeine Ordnung der Fibrillen nachweisen. Die Fibrillen stehen weiter auseinander, verglichen mit den Verhältnissen beim Menschen und die Abstände zeigen auch eine ausgeprägte Schwankungsbreite.

Diese Befunde können zur Erklärung der Transparenz und zur Diskussion der verschiedenen Transparenztheorien herangezogen werden. Die Vorstellungen von MAURICE (1957, 1960), der von einer hochgeordneten Brechung der Lichtstrahlen an einem ebenso hochgeordneten Gitter ausgeht, trifft wegen des Fehlens jeder Ordnung sicher nicht bei der Cornea des Frosches zu. Die zweifellos vorhandene Transparenz kann also damit nicht erklärt werden. Es liegt deshalb näher, die Theorie von SCHWARZ und KEYSERLINGK (1966, 1969, 1969) für wahrscheinlicher zu halten. Sie gehen von der Wichtigkeit der Partikelgröße aus. Eine Flüssigkeit mit kleinen Partikeln ist durchsichtig. Enthält sie dagegen große Partikel, wird sie trübe. Nach der Vorstellung dieser Autoren liegt der

Durchmesser der Fibrillen in der Cornea von Mensch, Hühnchen und Ratten bei einer durchschnittlichen Dicke von $200 \text{ \AA}$ unterhalb des Wertes, der zu einer Trübung führt. Da die Fibrillendicken im Stroma des Frosches ebenfalls in diesem Bereich liegt, gilt die in diesen Arbeiten entwickelte Theorie ebenfalls für die Cornea des Frosches. Die geringe Größe bzw. Durchmesser der Corneafibrillen stellen danach kein Hindernis für das Durchtreten der Lichtstrahlen im üblichen Wellenbereich dar. Für die Richtigkeit dieser Vorstellung kann auch das Vorkommen der Plaques aus dichtgepackten und vernetzten Filamenten herangezogen werden, die zwischen den Fibrillen-Lamellen und an den Fibrocytenfortsätzen lokalisiert sind. Ginge der Durchtritt der Lichtstrahlen allein durch einen Brechungsvorgang vor sich, so müßte das Brechungsdiagramm der endgültig die Retina erreichenden Strahlen durch die verschiedenen Dichten und Muster der Packungen von Filamenten und Fibrillenarten sehr verzerrt sein. Eine bessere Erklärung bietet auch hier wieder die Theorie von SCHWARZ und v. KEYSERLINGK. Hängt der Durchtritt des Lichtes von der Größe bzw. Dicke der Fibrillen ab, wie diese Autoren annehmen, so können die sher viel dünneren verflochtenen Filamente bei der Deutung vernachlässigt werden.

Die chemische Zusammensetzung der Filamente in den Plaques ist nicht sicher bekannt. Es kann aber vermutet werden, daß es sich hier ebenfalls um kollagene Strukturen handelt. Wie bereits bei der Besprechung

des Aufbaues der Basalmembran erwähnt wurde, muß davon ausgegangen werden, daß Kollagen in verschiedenen Aggregationsformen vorliegt. Die kollagenen Polypeptidketten - die morphologisch gesprochen etwa 4 Å breit und 2800 Å lang sind, können sich zu immer größeren Einheiten zusammenlagern: Tropokollagenmoleküle, Filamente, Fibrillen und schließlich zu Fasern und Texturen (MERKER, 1961; SCHWARZ 1964). Es kann deshalb postuliert werden, daß die Filamente aus Kollagen bestehen, das jedoch nur bis zur Filamentstufe aggregiert ist. Noch nicht eindeutig beantwortbar ist die Frage nach den Ursachen, die die Aggregation steuern und regulieren. Sicher bekannt ist nur - neben genetischen Effekten - der Einfluß von den Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) der bindegewebigen Grundsubstanz (WOOD, 1960) und die mechanische Belastung, d.h. der physikalische Einfluß (SCHWARZ, 1955). Beide Faktoren könnten in diesem Zusammenhang diskutiert werden. Die filamentären Plaques liegen ebenso zwischen den Fibrillen-Lamellen wie die Zellen. Da die Zellen für den "turn over" der Interzellulärsubstanz verantwortlich sind, d.h. auch GAG und PG bilden und die Fibrillenlamellen der freien Permeation sicher einen gewissen Widerstand entgegensetzen, kann man vermuten, daß hier besonders viele GAG und PG vorkommen. Wie wir aus Untersuchungen embryonalen Gewebes wissen, ist die Fibrillendicke unter diesen Bedingungen besonders gering (MERKER, 1961). Andererseits kann angenommen werden, daß zwischen den Fibrillen-Lamellen besonders

mechanische Verhältnisse herrschen, die nur die Bildung dünner Filamente, die darüber hinaus noch vernetzt sind, zulassen. Allerdings ist über diese Bedingungen nur wenig bekannt.

Zusammenfassung

=====

Untersucht wurde die Cornea des Frosches (*Rana esculenta*) unter besonderer Berücksichtigung des Corneastromas.

Die morphologische Messung erfolgte an ausgesuchten Präparaten, in denen die kollagenen Fibrillen parallel verliefen und exakt senkrecht erschienen. Die Relation des Kollagenvolumens zum Volumen der Kittsubstanz sowie die Dicke und Abstand der Fibrillen wurden nach dem Weibel'schen Verfahren berechnet.

Zwischen Epithel und Corneastroma läßt sich beim Frosch keine typische Bowman'sche Membran erkennen, sondern eine gut definierte Basalmembran von 300 Å bis 500 Å parallel zur basalen Zellmembran des Epithels. Unter der Basalmembran folgt eine ca. 1 bis 2 μ breite Zone. Die hier verlaufenden feinen Fibrillen bilden noch keine Lamellen, erst weiter unter lassen sich typische Fibrillen des Corneastromas erkennen, die parallel zur Hornhautoberfläche verlaufen, aber in unterschiedlichem Winkel zueinander. Sie sind hier zu Fibrillen-Lamellen zusammengefaßt. Die Fibrillen überkreuzen sich unter verschiedenen Winkeln. Der mittlere Durchmesser der Fibrillen liegt bei 25 nm. 26 % aller Werte lagen zwischen 20 und 27 nm. Der mittlere Abstand zwischen den Fibrillen beträgt 399 Å. Neben den Kollagenfibrillen besteht die Propria der Cornea aus Fibrocyten und feinfilamentären Materialien. Bei höherer Vergrößerung imponieren diese filamentären Elemente als verfilztes, dicht gepacktes Netzwerk, überwiegend zwischen Fibrillenlamellen und Fibrocyten

lokalisiert. Dabei werden sie von den intralamellären ausstrahlenden Fibrillen durchbohrt.

Die bipolaren Zellen mit ovalem, teilweise langgestrecktem Kern entsprechen den in anderen Tierarten gefundenen Zellen des Corneastromas. Im Cytoplasma kommen neben den üblichen Zellorganellen kurze Hohlräume des rauhen Endoplasmatischen-Retikulum vor.

Der Abschluß des Corneastromas zum Endothel wird durch die Descemet'sche Membran gebildet. Diese ist viel breiter als die oben beschriebene Basalmembran und kann Dicken bis zu 2 μ erreichen.

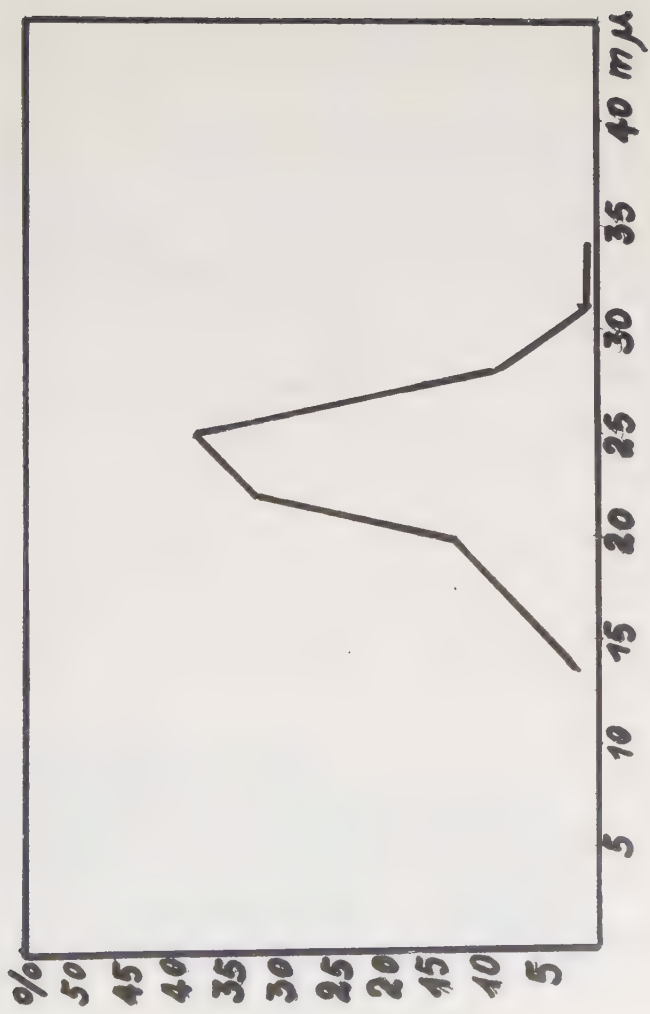
Die Cornea des Frosches besteht prinzipiell aus

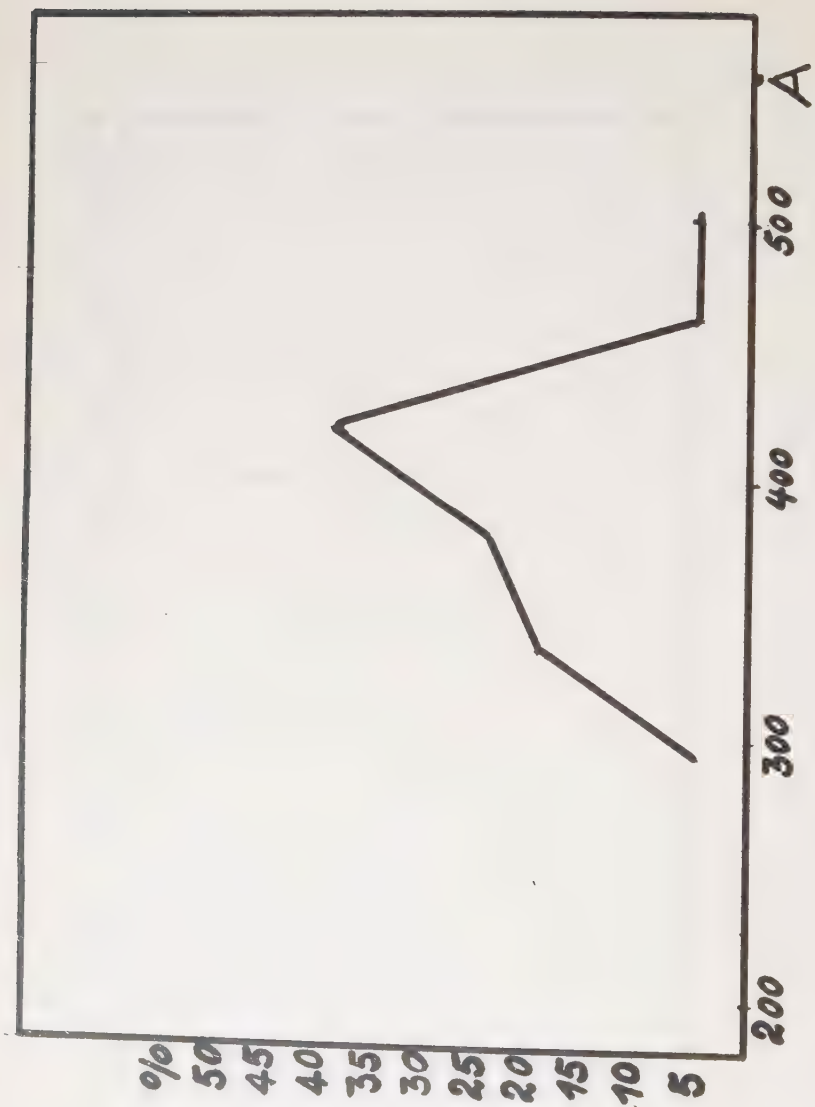
1. dem mehrschichtigen Epithel, 2. dem Stroma und
3. dem einschichtigen Endothel.

In den Einzelheiten ist das Fehlen der Bowman'schen Membran von besonderer Bedeutung. Dafür erkennt man eine in allen Einzelheiten erkennbare Basalmembran. Die Basalmembran besteht - wie bereits Untersuchungen ergeben haben - aus Kollagen, nicht kollagenem Eiweiß, Polysacchariden, Lipiden und Glycolipiden. Es ist nahelegend, daß die Bowman'sche Membran in ihrer Zusammensetzung der Basalmembran entspricht. Das Kollagen würde die filamentäre Komponente der Bowman'schen Membran darstellen und die übrigen Bestandteile wären in der Matrix lokalisiert.

Die Fibrillen des Corneastromas des Frosches sind gegenüber denen anderer Tierarten wenig dicht und sehr unregelmäßig gepackt. Diese Tatsache unterstützt

die Theorie der Transparenz der Cornea von
SCHWARZ und MA, wobei nicht die Anordnung,
sondern die Dicke der Fibrillen entscheidend
ist.





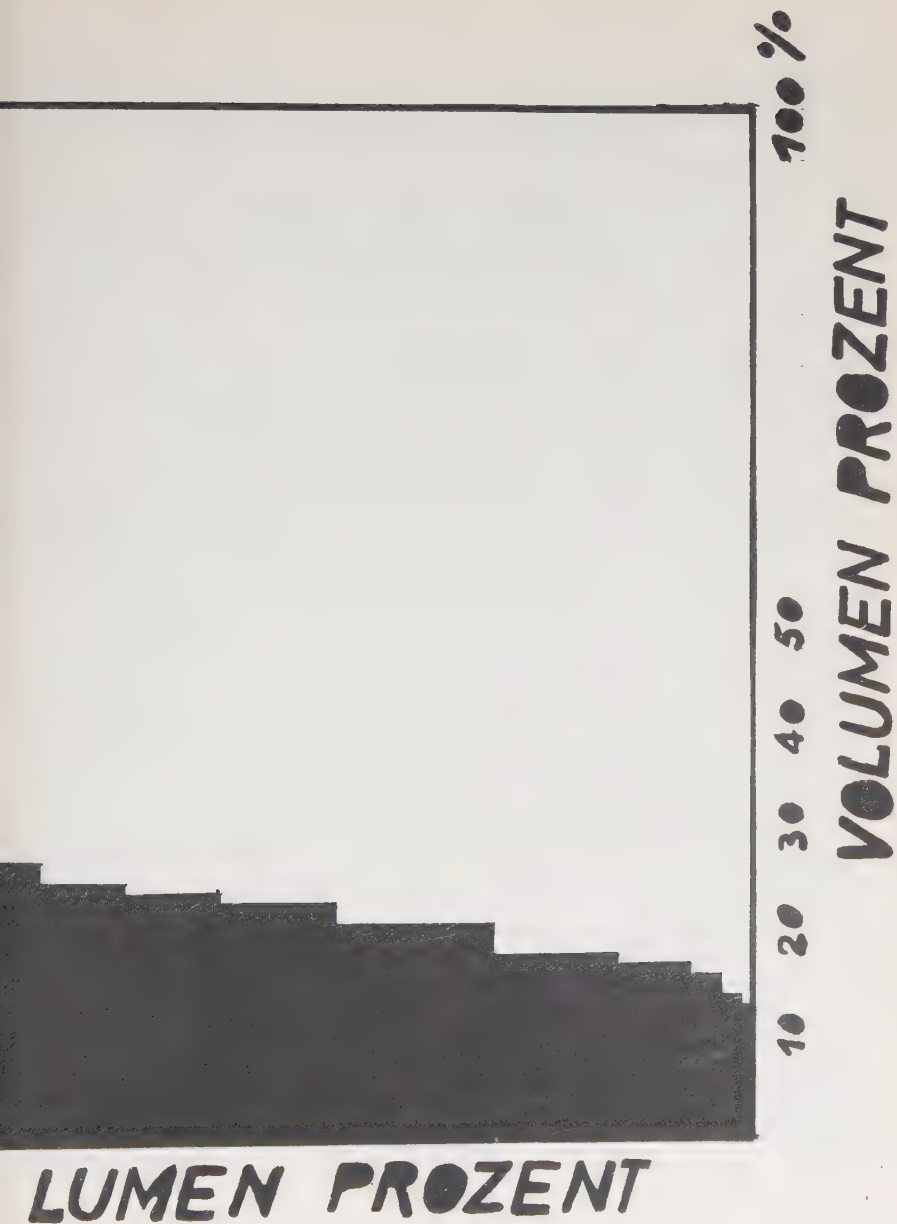


Abbildung 1: Basalanteil des Hornhautepithels (E)
mit weiten Interzellulärräumen (I).
Unter dem Epithel eine gut ausgebil-
dete Basalmembran statt Bowman'sche
Membran (BM). Im Stroma typische
Fibrillenlamellen im Querschnitt (a)
und Längsschnitt (b).
Vergrößerung 1 : 7 000



Abbildung 2: Corneaendothel (EN) mit dicker
Descemet'scher Membran (D) und an-
schließendem geschichteten Stroma
aus Fibrillenlamellen (S).

VK = vordere Augenkammer.

N = Nucleus der Endothelzelle.

No = Nucleolus der Endothelzelle.

Vergrößerung 1 : 2 000



Abbildung 3: Stärkere Vergrößerung der Hinterfläche
der Cornea. VK = vordere Augenkammer.
EN = Endothel. Pfeil ↗ = Zellverzahnung.
Pfeil ↘ = Basale Ausstülpung der Zell-
membran. D = Descemet'sche Membran.
S = Stroma mit Fibrillenbildung.
Vergrößerung 1 : 21 000



Abbildung 4: Stroma der Cornea mit geschichteten
Fibrillenlamellen (a und b).

F = Fibrocytenfortsatz.

Vergrößerung 1 : 7 000



Abbildung 5: Wie Abbildung 4.

F = Fibrocyt.

F₁ = Fibrocytenfortsatz.

Dazwischen eine Verdichtungszone der
interfibrillären Substanz (*)

Vergrößerung 1 : 7 000



Abbildung 6: Stärkere Vergrößerung aus dem
Fibrillenstroma mit zwei quer-
geschnittenen Fibrillenlamellen (a)
und zwei längsgeschnittenen (b).
Vergrößerung 1 : 40 000

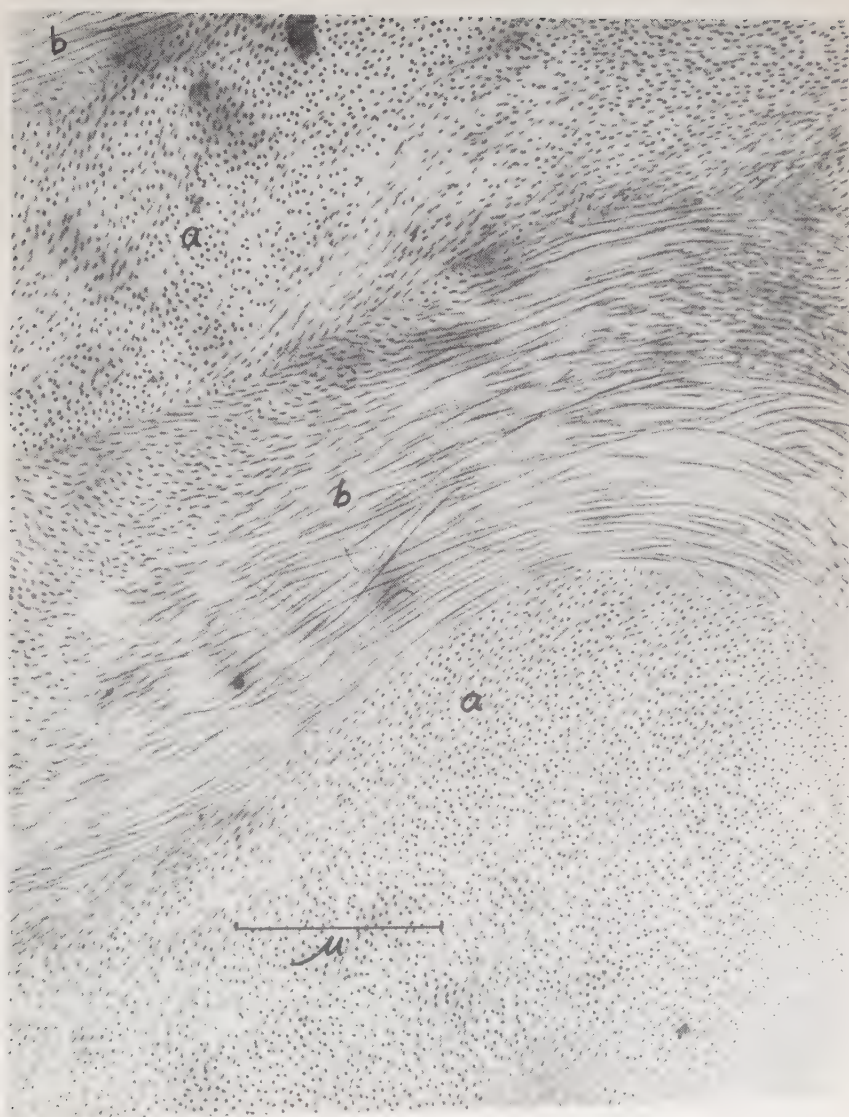


Abbildung 7: Ausschnitte aus dem Corneastroma mit
quergeschnittenen (a), längsgeschnittenen
(b) und schrägggeschnittenen (c) Fibrillen.
Zwischen den Fibrillen-Lamellen eine
feinfilamentäre Substanz (1/).
Vergrößerung 1 : 40 000

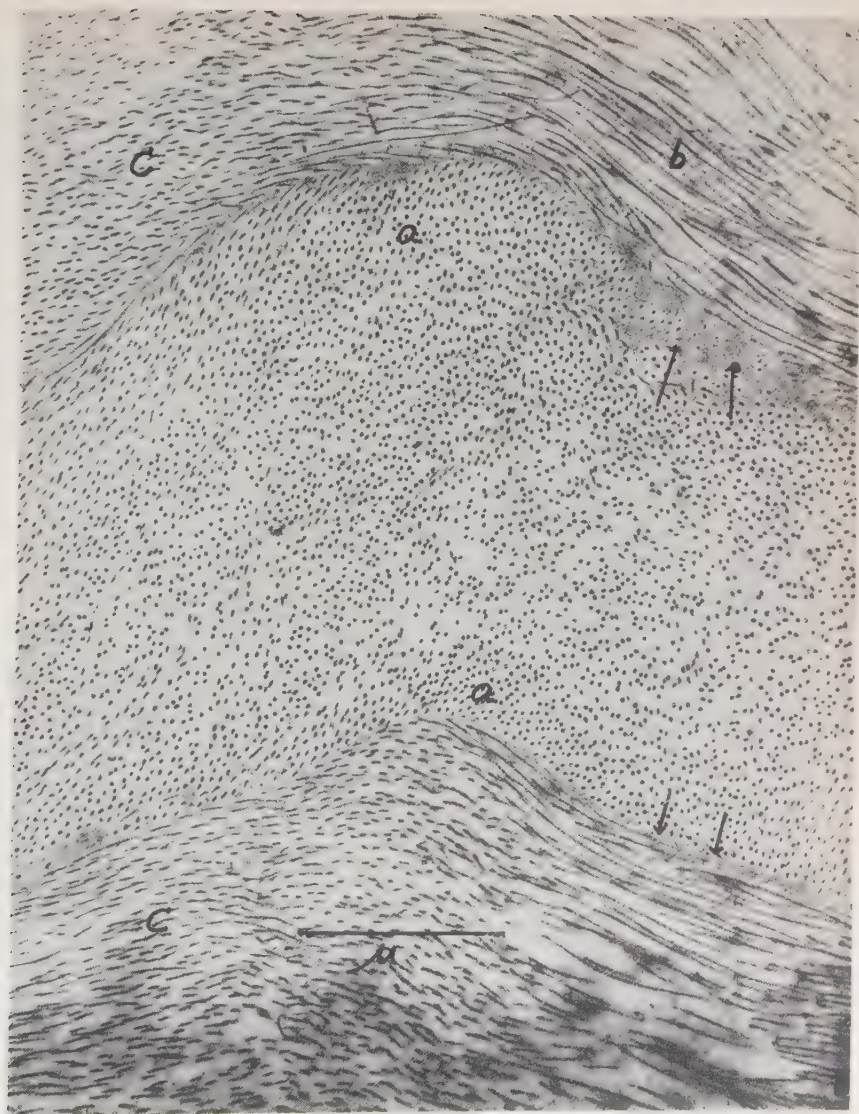
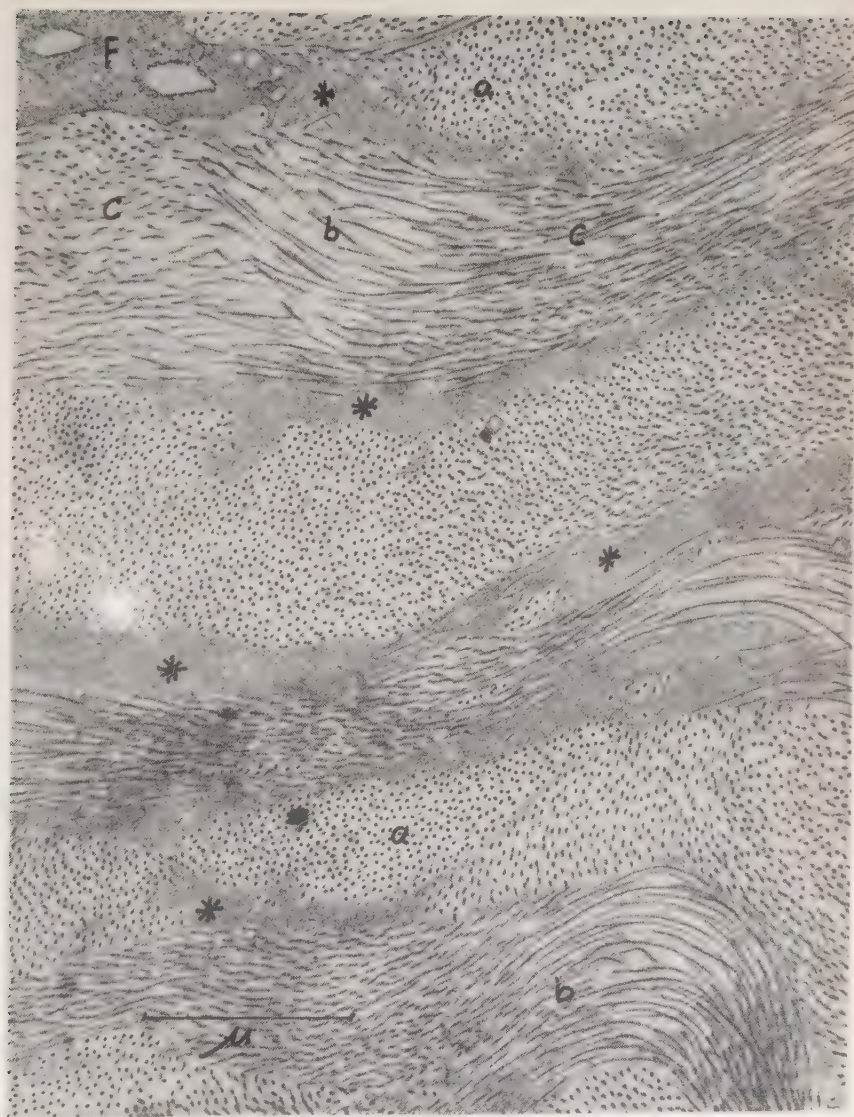


Abbildung 8: Ausschnitte aus dem Corneastroma
quergeschnittene (a),
längsgeschnittene (b) und
schräggesechnittene (c) kollagene
Fibrillen.

F = Fibrillenfortsatz.

* feines filamentäres Material.

Vergrößerung 1 : 40 000



LITERATURVERZEICHNIS

BONTING, C.L.; De BRUIN, H.; POLLACK, V.E.

J. clin. Invest. 40, 177 - 180 (1961)

Quantitative histochemistry of the nephron IV.

Hydroxyproline in the human glomerulum.

v. BRUCHHAUSEN, F.; MERKER, H.J.

Naunyn - Schmiedebergs Arch. 251, 1 - 12 (1965)

Gewinnung und morphologische Charakterisierung einer

Basalmembranfraktion aus der Nierenrinde der Ratte.

COULEMBRE, A.J.; COULOMBRE, I.L.

In: The structure of the eye (ed. by G.K. SMELSER)

Academic Press, New York and London, 1961, 405 - 420

The development of structural and optical properties of the cornea.

DISCHE, R.M.; PAPPAS, G.D.; GRAUER, A.; DISCHE, Z.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 63 - 70 (1965)

The carbohydrates of basement membranes of human kidney glomeruli.

FEHER, J.; VALU, L.

GRAEFE's Arch. 179, 65 - 73 (1969)

Über die Struktur der DESCOMET'schen Membran.

GRELL, O.

Dissertation an der FU Berlin, 1972

Die Feinstruktur der Hühnercornea.

HACKELBERG, H.

Dissertation an der FU Berlin, 1971

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung des Corneastromas bei der Ratte.

JAKUS, M.A.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 241 - 252 (1956)

Studies on the cornea. II. The fine structure of DESCemet's membrane.

JAKUS, M.A.

In: The structure of the eye. (ed. by G.K. SMELSER)

Academic Press, New York and London, 1961, 343 - 366

The fine structure of the human cornea.

JAKUS, M.a.

Ocular fine structure. Selected electron micrographs.

Little, Brown & Co. Boston, 1964

LANGHAM, M.E.; HART, R.W.; COX, J.

In: "The Cornea, Macromolecular Organization
of a connective tissue" ed. by. M.E. LANGHAM

Johns Hopkins Press Baltimore, London, 1969, pp. 157 - 184

MAURICE, D.M.

J. Physiol. (London) 136, 263 - 286 (1957)

The structure and transparency of the cornea.

MAURICE, D.M.

In: The transparency of the cornea

(ed. by. S. DUKE-Elder and E.S. PERKINS)

Paris, 1960. 41 - 49

The physics of corneal transparency.

MAURICE D. M.

In: The structure of the eye.

(ed. by G.K. SMELSER)

Academic Press, New York and London, 1961, 381 - 392

The use of permeability studies in the investigation of
submicroscopic structure.

MERKER, H.J.

Langenbecks Arch. klin. Chir. 297, 411 - 423 (1961)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese im menschlichen Granulationsgewebe.

ROGGENBAU, C.; WETTHAUER, A.

Klin. Monatsbl. Augenheilk., 78, 762 - 769 (1927)

Zur Frage der Durchlässigkeit der Hornhaut, Linse und
des Glaskörpers für kurzwelliges Licht nach Untersuchun-
gen an Rinds- und Kalbsaugen.

ROHEN, J.W.

Das Auge und seine Hilfsorgane

In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen

Bd. III/IV. Teil. Springer-Verlag Berlin-Göttingen-

Heidelberg-New York 1964

SCHLICHTING, H.

Dissertation an der FU Berlin

In Vorbereitung

Die Feinstruktur der Cornea vom Molch.

SCHLICHTING, E.

Dissertation an der FU Berlin

In Vorbereitung

Die Feinstruktur der Cornea vom Gecko.

SCHWARZ, W.

Z. Zellforsch. 38, 26 - 49 (1953)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau
der Sklera und der Cornea des Menschen.

SCHWARZ, W.

Die Zwischensubstanz des Bindegewebes

In: Kapillaren und Interstitium

Hersg. BARTELSHEIMER und KÜCHMEISTER

G. Thieme-Verlag, Stuttgart 1955, 29 - 40

SCHWARZ, W.

In: The structure of the eye

(ed. by. G.K. SIELER)

Academic Press, New York and London, 1961, 393 - 404

Electron microscopical studies of the fibrillogenesis in
the human cornea.

SCHWARZ, W.

Fibrillogenese und Entstehung elastischer Fasern

Arch. Biol. 75, 369 - 375 (1964)

SCHWARZ, W.

Periodische Strukturen in der DESCOMET'schen Membran

In Vorbereitung 1972

SCHWARZ, W.; MERKER, H.J.; JAHNKE, A.; HOFMANN, M.

Berliner Med. Sonderheft 10, 88 - 90 (1958)

Wachstum und Altern des Bindegewebes

SCHWARZ, W. und D. Graf KEYSERLINGK

(1969) Virchows Arch. Abt. A. Path. Anat. 347, 115 - 128

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an humanen Hornhautnarben und an einem getrübbten Hornhauttransplantat.

SCHWARZ, W. v. KEYSERLINGK, D.

Zeitschr. Zellforsch. 102. 78 - 84 (1969)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Cornea.

Aklara. Haut und Flosse eines durchsichtigen Fisches (Ambassis lala).

WEISS, P. FERRIS, W.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, (Suppl.) 275 - 282 (1956)

The basement lamella of amphibian skin. Its reconstruction after wounding.

WOOD, G.C.

Biochem. J. 75 605 - 612 (1960)

Reformation of fibrils from collagen solution.

L e b e n s l a u f =====

Ich, Carlos Alberto Menéndez, wurde am 22. 10. 1927 als Sohn des Kaufmanns Carlos Menéndez und dessen Ehefrau Concepcion de Menéndez in Moyuta, Departement Jutiapa in der Republik Guatemala geboren.

Ende 1939 absolvierte ich die Grundschule.

Als Folge des 2. Weltkrieges konnte ich nicht sofort die Oberschule besuchen. Dafür besuchte ich eine Schneiderei, wo ich einiges dieses Berufes erlernte. Von 1946 bis 1950 absolvierte ich die Oberschule und nach Erlangung meines Abiturium trat ich in die Medizinische Fakultät der SAN CARLOS Universität in der Hauptstadt Guatemala ein.

Im Januar 1954 kam ich nach Berlin und wurde im Okt. desselben Jahres zur Medizinischen Fakultät der FU zugelassen, wo ich mein ganzes Studium absolviert habe.

In Berlin habe ich auch meine Facharztausbildung für Innere Medizin durchgeführt.

1970 habe ich die deutsche Staatsangehörigkeit erhalten.

Ich bin seit 1958 verheiratet und habe zwei Kinder im Alter von 12 und 13 Jahren.

Zur Zeit bin ich als Oberarzt in der II. Inn. Abteilung des Städtischen Krankenhauses Tegel-Süd tätig.

Druck:

Der Präsident der Freien Universität Berlin
- Universitätsdruckerei -

1 Berlin 41, Kelchstraße 31

